

Újszülöttkori szűrővizsgálatok hagyományos módszerrel

Dr. Rózsa Melinda

SZTE ÁOK Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi
Központ, Szeged

Az újszülöttkori szűrővizsgálatok az anyagcsere-betegségek korai diagnosztizálására irányulnak. Klasszikus angol megfogalmazás szerint (Sir Archibald Gerrod, 1902) anyagcsere-betegségen egy enzim vagy hormon működési zavarát értjük az intermedier anyagcsere-folyamatban. A több, mint egy évszázados meghatározás csak annyiban finomodott napjainkig, hogy az enzim működési zavarán már nem csak magának az enzim aktivitásának csökkenését, hanem a működéséhez szükséges kofaktorok hiányát, transzportfehérjék működési zavarát is értjük. Hazánkban az alábbi 4, viszonylag magas gyakoriságú és eredményes terápiájú anyagcsere-betegségre van kötelezően előírt újszülöttkori szűrővizsgálat: 1. *fenilketonúria*, 2. *galaktozémia*, 3. *hypothyreosis*, 4. *biotinidáz hiány*.

Az aminosavak és acilkarnitinek MS/MS tandem tömegspektrometriás újszülöttkori szűrővizsgálatának bevezetésével több, anyagcserebetegség során felszaporodó kóros termék mutatható ki egy méréssel. Az enzim- és hormonmeghatározások jelenleg még nem végezhetők MS/MS módszerrel, ezért a galaktozémia, hypothyreosis és a biotinidáz hiány kimutatása hagyományos szűrőmódszerrel történik, ún. Guthrie-kártyára szárított vérmintából.

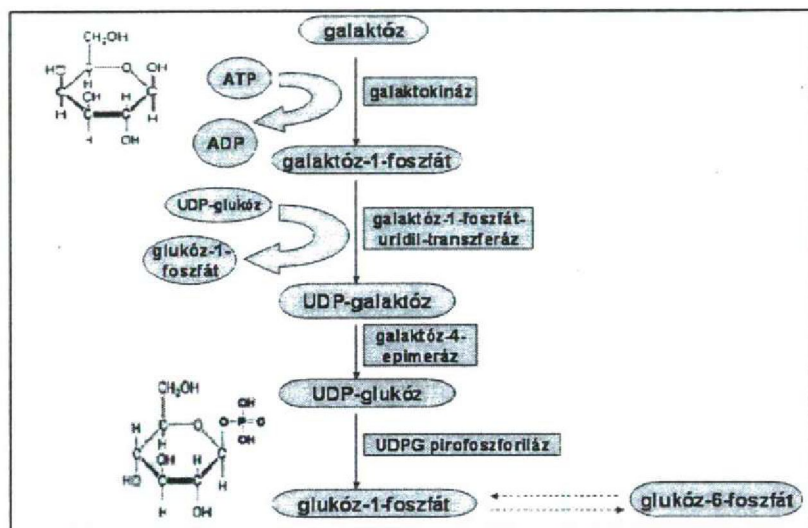
Galaktozémia

Galaktozémiában a tejcukor bontása során keletkező galaktóz glükóz-zá való átalakulása valamelyik lépésben gátolt.

A galaktózt a glükóztól a 3. szénatomon elhelyezkedő -OH (hidroxil) csoport térbeli helyzete különbözteti meg. A tejcukor egy diszaharid,

mely ebben a formájában nem tud felszívódni a vékonybélből, ezért a laktáz enzim glükóz és galaktóz monoszaharidokká hidrolizálja. Míg a keletkező glükóz már az energiatermelő folyamatok kiindulási anyaga, addig a galaktóznak ehhez át kell alakulnia glükóz-1-foszfáttá (1. ábra). Ebben az átalakítási folyamatban 4 enzim játszik szerepet: 1. galaktokináz, 2. galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz, 3. galaktóz-4-epimeráz, 4. UDPG pirofoszforiláz.

A klinikai tünetek és az anyagcsere-betegség szempontjából csak az első két enzimnek, a galaktokináznak és a galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáznak van jelentősége.



1. ábra

Galaktokináz enzimhiány

Újszülöttkorban tünetmentes, de tejtáplálás után galaktozémia (emelkedett galaktózszint a vérben) alakul ki. A felszaporodó galaktóz az aldózreduktáz enzim hatására galaktitollá alakul, mely cataractához vezet, felnőtt korban vakság is előfordulhat. Ritkán szellemi retardáció is kísérheti.

Galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz (G-1-PUT) enzimhiány

Más néven *klasszikus galaktozémia*. Tünetei gyorsan manifesztálódnak és súlyosak. Az újszülöttek ösztönösen tiltakoznak az anyatejtáplálás ellen, de bizonyos idő eltelte után elfogadják, melyre hányással, hasmenéssel reagálnak. Ha az anyatejtáplálás folytatódik, elhúzódó sárgaság,

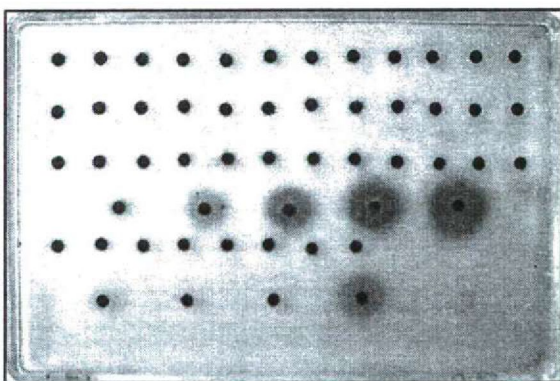
veseelégtelenség, a máj megnagyobbodása, fejlődési zavar, cataracta, mentális retardáció, súlyos enzimhiány esetén halál is bekövetkezhet.

Duarte-galaktózémia, a G-1-PUT transzferáz enzim hiányának enyhébb változata

Klinikai tünetekkel nem jár, csak enyhén emelkedett galaktózszint mérhető közvetlenül étkezés után. Az anyatejtáplálás megszorítása nem indokolt.

Az újszülöttkori mintavételek időpontja a korábbi hazabocsátások miatt a 48 és 72 óra közé tevődött át. Galaktózémia szűrésénél nem magát az enzimet határozzuk meg, hanem az enzim hiánya következtében felszaporodó anyagcsereterméket (prekuzort), ezért nagyon fontos, hogy a szűrés idején az újszülöttek megfelelő mennyiségben fogyasszanak anyatejet (napi 60 ml).

Ha ez nem történik meg a mintavétel időpontjáig, és az újszülött hazaadásra kerül, az elbocsátó intézetnek az édesanyát egy Guthrie-kártyával kell ellátnia. Amennyiben a gyermek már a szükséges mennyiségű anyatejet vagy az annak megfelelő mennyiségű tápszert elfogyasztotta, a védőnő vagy a háziorvos segítségével a kapott szűrőpapírra le kell venni a vérmintát, és azt a kijelölt szűrőközpontba kell eljuttatni galaktózémia szűrésre.



2. ábra.

**Normál határérték:
10 mg%**

A galaktózémia szűrését 1974-ben kezdték meg a Szegedi Gyermekklinikán az ún. Guthrie-féle mikrobiológiai módszerrel. A metodika lényege, hogy galaktózra érzékeny mutáns *E. coli* (W5) baktériumtörzset és metilénkék indikátort tartalmazó agaróz táptalajra helyezünk fel a vérrel átitatott szűrőpapír korongokat, különböző koncentrációjú (5, 10, 20, 40, 80 mg%) galaktóz standardok mellett. A baktérium emésztí az indikátort, ezért a növekedési zóna területén a kék szín elhalványodik, miközben a kioltási zónák sötétkék színe jól értékelhető (2. ábra).

Akár galaktokináz, akár G-1-PUT enzimhiányról van szó, emelkedett galaktóz értékkel szűrjük ki az újszülötteket.

A monoszaharidok számára a sejtmembrán mindkét irányban átjárható. A sejtbe bekerülő monoszaharidot a kináz enzim foszforilálja, innentől kezdve a sejt csapdájába esik, és a monoszaharid-foszfát számára a sejtmembrán átjárhatatlanná válik.

Galaktokináz enzim hiányában a sejtbe bekerülő galaktóz nem tud továbbalakulni galaktóz-1-foszfáttá, ezért a galaktóz további beáramlása leáll, és a galaktóz gradiens következtében a véráramban emelkedett marad a galaktóz szintje. G-1-PUT enzimhiány esetén a sejtbe kerülő galaktóz a kináz enzim hatására átalakul galaktóz-1-foszfáttá, de a transzferáz enzimhiány következtében nem tud továbbalakulni. Mivel a sejtmembránon keresztül történő kiáramlása gátolt, ezért felszaporodik a sejten belül. A felszaporodó galaktóz-1-foszfát a feed-back mechanizmus következtében leállítja a galaktokináz enzim működését, ennek hatására leáll a sejtbe történő galaktóz beáramlás, így a galaktóz gradiens következtében a véráramban ismét magas marad a galaktóz szintje.

Zavaró tényezők esetén ismételt mintakérés szükséges.

Ál-negatív eredmény:

- Ha a vérmintát a tejtáplálás megkezdése előtt vették le.
- Ha a szűrőpapír nem volt megfelelően átitatva vérmintával.
- Ha az újszülött transzfúziót kapott (mivel a G-1-PUT enzimet túlnyomórészt az eritrociták termelik, a transzfúzióval bekerülő vvt-k még hónapokig megemelik a transzferáz enzimszintet)

Ál-pozitív eredmény:

- Ha olyan antibiotikumot kapott az újszülött, ami gátolja az E-coli növekedését.





































Annak eldöntésére, hogy a kioltási zónát a baktériumnak az antibiotikumra való érzékenysége vagy a magas galaktóz szint okozta, a Weidemann-próbát használjuk, mely a galaktóz mennyiségének szemi-kvantitatív meghatározására szolgál (10 mg% fölött).

Elve: a galaktóz-dehidrogenáz (Gal-DH) enzim a galaktózzal a NAD-ra hidrogént visz át, fluoreszkáló NADH-t képezve. Ha a vérminta nem tartalmazott emelkedett mennyiségben galaktózt, a fluoreszcencia elmarad, így biztosan állíthatjuk, hogy a kioltási zónát az antibiotikum okozta.

A Weidemann-teszt az alapja a jelenleg használt ELISA „össz-galaktóz” mennyiségi meghatározásnak. A nitroblue-tetrazolium (NBT)

indikátor NADH hatására jól fotometrárlható ibolyaszínű terméket képezve redukálódik, melynek intenzitása arányos a galaktóz mennyiségével.

A kiszűrt magas galaktózszintről el kell döntenünk, hogy a galaktokináz enzim hiánya, vagy a G-1-PUT enzim hiánya okozta. Erre alkalmas a *Beutler-próba*, mely a G-1-PUT enzim szemikvantitatív mennyiségi meghatározása.

Idő (perc)	0	30	60	90	120	150
Kontroll						
Galactosaemia heterozygote						
Galactosaemia classic						
Galactosemia variant						
Duarte variant						
Galactosemia variant						

3. ábra. Beutler-próba

Elve: G-1-PUT jelenlétében a NADP redukálódik fluo-oreszkáló NADPH-t képezve (UV 360 nm). A vizsgálathoz heparinnal levett teljes vért használunk. A *vér + galaktóz-1-foszfát + NADP* elegyből 30 percenként szűrőpapírra 10 ul-

nyi mintákat csepegtetve nézzük a fluoreszcencia jelenségét (3. ábra).

Az eredményt mindig a kontrollhoz viszonyítva adjuk meg. Például a "Galactosaemia variant" esetében 90 perces enzimaktivitás-csökkenés tapasztalható a kontrollhoz képest. Fél órás enzimaktivitás-csökkenéssel még semmi teendő nincs, sőt irodalmi ajánlások szerint egészen 60 perces enzimaktivitás-késésig nem kell anyatej megvonást alkalmazni. 60 perc felett már különböző mértékű laktózbevitel megszorítást kell alkalmazni. Ha a mintánk még 120 percnél sem jelez enzimaktivitást, az anyatej-táplálást azonnal le kell állítani.

Emelkedett galaktózsztint kiszűrése után, ha a Beutler-próba enzimaktivitása normális, akkor a galaktokináz enzimhiány okozta a magas galaktózsztintet. Amennyiben a Beutler-próbánk a G-1-PUT enzimaktivitás csökkenését jelzi, akkor ennek az enzimnek a hiánya következtében emelkedett meg a galaktóz értéke.

G-1-PUT enzimaktivitás mennyiségi mérésére már vannak forgalomban kitek, de az alsó értéktartományokban a próbavizsgálatoknál még nem kaptunk megbízhatóbb eredményeket, mint amit maga a Beutler-próba ad. A tejtáplálás megvonását, az eddig kiszűrt transzferázos betegeink eredményei alapján a 2,9 U/gHb érték alatti enzimaktivitások esetében kell alkalmazni.

A galaktokináz és a G-1-PUT enzim génjeinek több száz mutációja ismert. Ezek rendkívül sok kombinációja fordulhat elő, melyek különböző mértékű enzimaktivitás-csökkenést okoznak. Az enzimhiányos betegek génjének szekvenálása további előrelépést jelent a galaktozémia betegségének mélyebb megismerésében.

Gyakorisága: klinikánkon évente átlag 1 G-1-PUT enzimhiányos gyermeket (1:50.000) és 3–4 galaktokináz enzimhiányos gyermeket szűrünk ki, mely a területi eloszlás miatt majdnem az országos szinten összesen kiszűrt gyermekeket jelenti (1:25.000).

Hypothyreosis

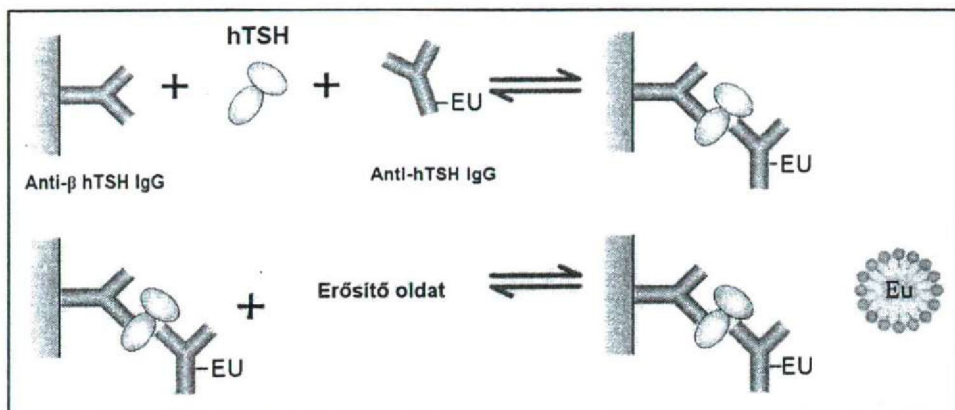
A pajzsmirigy follikulusait kitöltő egyik fehérje a thyreoglobulin, mely a T₃ és T₄ előanyaga. A jód elemi formában kapcsolódik a thyreoglobulinban lévő tirozin oldalláncokhoz thyrioid-peroxidáz enzim katalízisével. A véráramból a pajzsmirigybe kerülő jód koncentrációja 20–30-szorosára megemelkedik. Ezután két jódozott tirozinmolekula szubsztitúciós reakcióban tetrajód-tironinné alakul, amely még biológiailag inaktív, és csak akkor válik aktív hormonná, amikor a fehérjéből specifikus proteáz hatására kihasadva a véráramba kerül. A jódozottság fokától függően egy molekula tironin három (T₃) vagy négy (T₄) jódatomot tartalmazhat. A vérben a pajzsmirigyhormonok 90%-a T₄ formában fordul elő, ahol élettartamát a tiroxinkötő globulin fehérje (TBG) határozza meg. A tiroxin a célsejteken disszociál a TBG-ről és egy dehalogenáz enzim a T₄-et T₃-má alakítja. A sejten belül a T₃ a thyreoid-hormonreceptoron keresztül DNS-hez kötődik, és számos sejtféleségben indukál különböző fiziológiás vagy patológias elváltozásokat.

A vér tiroxinszintje feedback mechanizmussal szabályozza saját szintézisét. A T₄ magas szintje gátolja a hypothalamus thyreotropin releasing hormon (TRH) és a hypophysis thyreoida stimuláló hormon (TSH) kiválasztását, amely utóbbi serkenti a pajzsmirigyben a tiroxin szekrécióját.

Az újszülöttkori hypothyreosis szűrését Magyarországon 1985-től a thyreoida stimuláló hormon (TSH), és nem a tiroxin (T₄) mérésével végezzük.

Örökölt TBG hiányában normális szabad T₄ (FT₄) és TSH értékek mellett alacsony tiroxin (T₄) szintet határozunk meg. A T₄ vizsgálatán alapuló szűrésekben ezek a gyermekek gyanúsak, ill. az álpozitívak közé kerülnek.

Klinikánkon a congenitalis hypothyreosis szűrését fluorimetriás ELISA módszerrel végezzük (4. ábra).



4. ábra

Elve: A humán TSH molekula egy α és egy β láncból álló globulin. ELISA lemez falára humán TSH β lánc ellen termelt IgG-t visznek fel, melyhez kötődik az újszülött mintájában lévő TSH. A következő lépésben egy európiummal jelzett, humán TSH α és β lánc ellen termelt IgG-t adunk a rendszerhez, ami kötődik az előző komplexhez, kialakítva az úgynevezett „szendvics”-szerkezetet. Megfelelő mosási eljárások után már csak az ELISA lemez falán lévő szendvics-komplex van jelen. Ehhez egy „erősítő” oldatot adva az európium leválik a komplexről és megfelelő hullámhosszúságú fénnel besugározva fluoreszkál. A kibocsátott jelet fluoriméterrel mérjük melynek intenzitása arányos a mintánkban lévő TSH mennyiségével.

Zavaró tényezők:

- Az európiummal kelátot képző anyagok pl. EDTA. Ebben az esetben az európium nem fluoreszkál.
- A szűrőpapír nincs jól átítatva vérmintával.
- Ha a szűrőpapír hőhatásnak van kitéve, mivel a TSH fehérje denaturálódhat.

Az újszülöttkori TSH-érték a születés után közvetlenül hirtelen megemelkedik, majd viszonylag gyorsan, 1–2 nap után normalizálódik. Jelenleg a cut-off értékünk 18 $\mu\text{U/ml}$ teljes vér, mely 39,6 $\mu\text{U/ml}$ szérumértéknek felel meg. Átmeneti emelkedést tapasztalunk extrém jóddhiány, terhesség alatt szedett hireosztatikumok, anyai blokkoló ellenanyagok esetében (1:5.000).

Klinikai tünetek: Szellemi visszamaradottság (FT4 hiány), kutacsok nyitottsága, növekedési zavar, köldöksérv, száraz, „márványozott” bőr, hypothermia, elhúzódó icterus, lethargia, székrekedés, szopási nehézségek, passzivitásuk miatt ezek „JÓ” gyerekek!

Gyakorisága: 1:4.000. Koraszülötteknél gyakran tapasztalunk tranzi-torikus emelkedést.

Biotinidáz hiánybetegség

A biotinidázhiány a biotin (H vitamin vagy B7 vitamin) recirkulációjának örökletes anyagcsere zavara, mely összetett karboxilázhiányhoz vezet.

A biotin egy kéntartalmú vízoldékony vitamin, mely a CO₂ csoportot átvivő karboxiláz enzimek kofaktora. A koenzimek (kofaktorok) általában kis molekulatömegű, hőstabil vegyületek, gyakran olyan molekulák származékai, melyeket az emberi szervezet egyáltalán nem, vagy csak kis mennyiségben képes előállítani, ezért a táplálékból vitamin formájában veszi fel. Az enzim és a koenzim kapcsolatából kialakuló komplex a holoenzim, míg a kofaktorától megfosztott inaktív enzim az apoenzim.

A biotin négy CO₂-gyököt átvivő karboxiláz enzim kofaktora.

	<i>Biotin (koenzim)</i>	<i>Biokémiai funkció</i>
1	acetyl-CoA karboxiláz	
2	3-metilkrotonil-CoA karboxiláz	leucin lebontás
3	propionil-CoA karboxiláz	aminosavak és propionátok glükózzá való alakítása
4	piruvát karboxiláz	máj glükoneogenezis

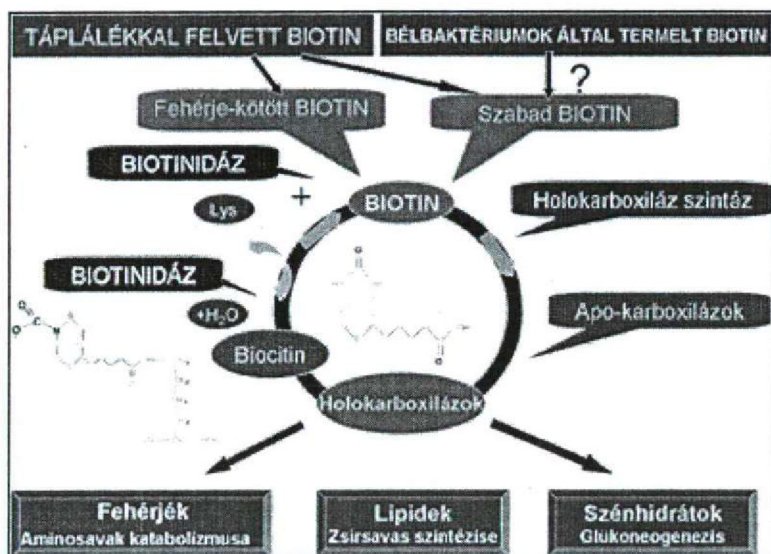
1. A zsírsavszintézis legfontosabb szabályzó lépése az acetyl-CoA → malonil-CoA átalakulás. Az *acetyl-CoA-karboxiláz* enzimhez kapcsolódott biotin egy ATP energiájának terhére megköti a CO₂-t és az aktiválódott CO₂ csoport áthelyeződik a biotinról, miközben malonil-CoA keletkezik.

2. A leucin lebomlása során keletkező telítetlen *3-metilkrotonil-CoA* a biotin dependens *karboxiláz* enzim hatására metilgluakonil-CoA-vá alakul át.

3. Az elágazó láncú aminosavak lebontása során propionil-CoA keletkezik, ami a *propionil-CoA-karboxiláz* enzim katalízisével metil-

malonil-CoA-vá alakul át. A páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációjakor az utolsó lépésben egy propionil-CoA maradék képződik, mely karboxilálásával szintén metil-malonil CoA keletkezik. A biotin ebben a folyamatban is kofaktorként játszik szerepet.

4. A glükoneogenezis során a *piruvát karboxiláz* katalizálja a piruvát \rightarrow oxálacetát átalakulást. Az enzim négy azonos alegységből áll, melynek mindegyike egy-egy molekula biotint köt meg. A folyamat energiaigényét itt is, mint minden karboxilezési folyamatnál, az ATP szolgáltatja.



5. ábra.
A biotin
körforgása

Szervezetünkbe a legtöbb biotin táplálékkal kerül be, túlnyomórészt fehérjéhez kötött formában. Biotinidáz enzim hatására a biotin leválik és aktív kofaktorként vesz részt az anyagcsere folyamatokban. Legtöbb biotint a tojássárgája, máj, élesztő és az olajos magvak tartalmazzák. Biotin kerülhet szabad formában is szervezetünkbe egyrészt élelmiszerekkel, másrészt a bélbaktériumok is termelnek saját anyagcsere folyamataikhoz, és az általuk ürített biotin egy részét a szervezet képes abszorbeálni. A felszívódás mechanizmusa és mértéke még nem tisztázott, mint ahogy az sem, hogy milyen mennyiségű a napi biotinbevitel szükségletünk.

A biotin a holokarboxiláz szintáz enzim segítségével kapcsolódik az apo-karboxiláz enzimhez, létrehozva ezáltal a holokarboxiláz aktív enzimet. Az így létrejött holokarboxiláz enzimek vesznek részt a karboxilezési folyamatokban. A holokarboxiláz enzim bomlása során keletkező

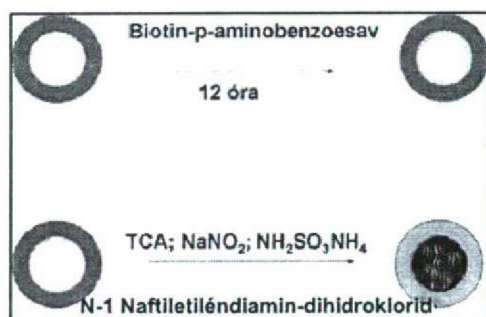
biocitint a biotinidáz enzim lizinre és biotinre hidrolizálja. A visszanyert biotin egy része a vizelettel és a széklettel kiürül, a többi ismét bekerül a körforgásba.

A többszörös karboxilázdefektus két típusa különíthető el.

I. típus: Biotinidáz enzim hiánya. Infantilis forma („late-onset”), amely 2–10 hónapos korban manifesztálódik.

A biotinidáz enzim defektusa (csökkent működése) miatt a holokarboxilázok degradációja révén keletkező biocitinből, illetve biotinil peptidekből a biotin elégtelen mértékben nyerhető vissza. A betegség kezelése biotin pótlással történik.

Tünetek: hajhullás, alopecia, seborrhoeás bőrgyulladás, száraz bőr exanthemákkal, candidiasis, keratoconjunctivitis, halláscsökkenés, opticus atrophia, ketolacetát-acidózis (emelkedett liquor-tejsav és piroszőlősav szint) és organikus aciduria is társulhat.



6. ábra.

Az enzim kémiai meghatározása ELISA módszerrel történik

Az újszülött szűrőpapír mintájához biotin-p-aminobenzoatesavat adunk feleslegben. Amennyiben a vérminta enzimaktivitással rendelkezik, lehasítja a biotint, és a paraamino-benzoatesav színreakcióba vihető az N-1-naftiletiléndiamin-dihidrokloriddal. A keletkezett ibolyaszín intenzitása arányos a mintában lévő enzim aktivitásával. Normálérték: 0,25 mmol EA felett.

Hibalehetőség:

- A szűrőpapír nincs megfelelően átitatva vérmintával.
- A vérminta hőhatásnak lett kitéve és az enzim denaturálódott.
- Transzfúzió vagy vércsere álnegatív eredményt okozhat.
- Koraszülöttség esetén átmeneti enziméretlenség alakulhat ki.

II. típus: súlyos, (ritka) újszülöttkori forma. A holokarboxiláz-szintáz enzim csökkent aktivitása következtében alakul ki, illetve az enzim mű-

kódése gátolt a biotinnak az apokarboxilázhoz való nem megfelelő kötődése miatt.

Természetesen magának az apokarboxiláz enzimnek a csökkent működése is ugyanazokat a tüneteket idézi elő.

Tünetek: hányás, lethargia, hypotonia, ataxia, myoclonus, ismétlődő görcsök, fejlődésben való elmaradás, progresszív esetben coma, agyi károsodás, exitus, ketolacetát-acidózis (emelkedett liquor-tejsav és piro-szőlősav szint) és organikus aciduria társulhat.

Az enzimek aktivitásának csökkenése különböző anyagcseretermékek felszaporodását idézik elő, melyek MS/MS tömegspektrometriás módszerrel jól azonosíthatók.

